

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Sledování účinku atorvastatinu na proces aterogeneze
u apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} double knock-out myšího modelu
aterosklerózy II.

Studying of atorvastatin effects on atherogenesis
in apoE^{-/-}/LDLR^{-/-} double knock-out mouse model
of atherosclerosis II.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové 2008

Jana Zajíčková

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem zadanou diplomovou práci zpracovala sama s přispěním vedoucího práce a používala jsem pouze literaturu a zdroje, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány. Dále prohlašuji, že nemám námitek proti půjčování nebo zveřejňování mé diplomové práce nebo jejích částí se souhlasem katedry.

Datum: 5. 5. 2008

.....

podpis diplomanta

Poděkování

Dovoluji si poděkovat PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, poskytnuté rady a za veškeré konzultace při práci v laboratoři.

ABSTRAKT

Ateroskleróza je degenerativní onemocnění cévní stěny, které postihuje všechny věkové skupiny obyvatel, je v dnešní době velice rozšířené a je i jednou z nejčastějších příčin úmrtí ve všech ekonomicky vyspělých zemích. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu.

Dvojnásobně knockoutované myši (apoE/LDL receptor deficientní) reprezentují model pro studium aterogeneze, který je schopen rozvinout závažné stupně hyperlipidémie i aterosklerózy.

Nejvýznamnější a nejpoužívanější skupinou léčiv snižující významně hladiny celkového a LDL cholesterolu a zároveň snižující mortalitu i morbiditu v důsledku kardiovaskulárních nemocí jsou statiny.

Cílem této práce bylo zjistit a popsat expresi SMAD 2/3 v aterosklerotických plátech u apoE/LDL-receptor deficientních myší a studium ovlivnitelnosti těchto proteinů podáváním atorvastatinu.

Při studii byly použity samice myší staré 8 týdnů. Zvířata byla rozdělena do 2 skupin. Kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 100 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

Výsledky biochemické analýzy ukázaly, že osmitýdenní podávání atorvastatinu výrazně snížilo hladiny celkového cholesterolu i TAG.

Imunohistochemické barvení prokázalo expresi SMAD 2/3 v celé oblasti aterosklerotického plátu, tedy uvnitř plátu, na endotele plátu i na intimě mimo plát.

Western blot analýza prokázala nárůst exprese SMAD 2/3 ve stěně cévy po podávání atorvastatinu.

Tyto výsledky naznačují, že SMAD 2/3 může být potenciálním cílem účinku atorvastatinu. Zároveň by mohl také působit antiaterogenně a mohl mít pozitivní vliv na vlastnosti cévního endotelu.

ABSTRACT

Atherosclerosis is a degenerative disease of blood-vessel wall, which attacks all population. It is very widespread and nowadays it is also one of the most frequent causes of death in the all economically advanced countries. In recent years the extensive research of atherosclerosis have brought a number of new pieces of knowledges, which have contributed to understanding of actions that happen during the process of atherogenesis.

ApoE/LDL – receptor double knockout mice represent an animal model for study of atherogenesis, which is able to evolve severe hyperlipidaemia and atherosclerosis.

Statins are currently the most considerable and the most useful hypolipidemic drugs. They significantly decrease levels of total cholesterol and LDL cholesterol and also decrease mortality and morbidity of cardiovascular diseases.

The aim of the diploma thesis was to find out and describe the expression of SMAD 2/3 in atherosclerotic plaques in apoE/LDL-receptor deficient mice and to study possible atorvastatin effects on its expression.

The female mice at the age of eight weeks were used in the study. Animals were divided "into" two "groups. The "control" group "of "animals" was fed with the western type diet. Vj g"same atherogenic diet was"used in""atorvastatin group,"where"atorvastatin"was"added to the atherogenic diet at the dosage of 100 mg/kg per day.

The results of the biochemical analysis demonstrated that eight weeks atorvastatin treatment significantly decreased the levels of total cholesterol and triglycerides.

The imunohistochemical detection showed the expression of SMAD 2/3 in whole atherosclerotic lesion, thus within plaque, in endothelium of plaque and also in intima outside of plaque.

The western blot analysis confirmed increase of the expression of SMAD 2/3 after atorvastatin treatment.

These results indicate that SMAD 2/3 could be potencional target of atorvastatin treatment and suggest these proteins could have antiatherogenic properties and positive effect on endothelial function.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	5
10 ÚVOD.....	7
20 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV	10
2.1.1 <i>Artérie</i>	10
2.1.2 <i>Vény</i>	12
2.1.3 <i>Kapiláry</i>	13
2.2 ATEROSKLERÓZA	14
2.2.1 <i>Rizikové faktory aterosklerózy</i>	15
2.2.2 <i>Teorie vzniku aterosklerózy</i>	20
2.2.3 <i>Aterogeneze, vývojové stupně aterosklerózy</i>	22
2.2.4 <i>Transformující růstový faktor β (TGF-β)</i>	25
2.2.5 <i>SMAD</i>	26
2.3 STATINY	28
2.3.1 <i>Mechanismus účinku</i>	28
2.3.2 <i>Nelipidové (pleiotropní) účinky statinů</i>	29
2.3.3 <i>Atorvastatin</i>	31
30 PRAKTICKÁ ČÁST.....	34
3.1 CÍL PRÁCE	35
3.2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
3.2.1 <i>Zvířata a předepsaná dieta</i>	36
3.2.2 <i>Biochemická analýza</i>	36
3.2.3 <i>Imunohistochemie</i>	37
3.2.4 <i>Statistická analýza</i>	39
40 VÝSLEDKY.....	40
4.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA.....	41
4.2 IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA	42
4.3 WESTERN BLOT ANALÝZA	44
50 DISKUZE	45
60 ZÁVĚR.....	49
70 LITERATURA	51

10 ÚVOD

Ateroskleróza se někdy označuje jako „nemoc 20. století“. Netrápí ovšem jen naši moderní civilizaci, ale provází lidstvo už dlouhá tisíciletí. Znamky kornatění tepen můžeme pozorovat už na mumiiích staroegyptských faraónů. Změn na cévách postižených aterosklerózou si všímal už italský renesanční géníus Leonardo da Vinci. [1] Dnes je ateroskleróza jako společný jmenovatel kardiovaskulárních onemocnění nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých státech Evropy a USA, má na svědomí více než 50 % všech úmrtí. Česká republika patří v úmrtnosti na komplikace aterosklerózy bohužel na přední místa ve světě.

Ateroskleróza neboli kornatění cév je zánětlivé a degenerativní onemocnění, které se rozvíjí pomalu a nenápadně. Řadu let probíhá bez příznaků, bezbolestně. Příznaky se objeví až potom, co dojde ke kritickému zúžení cévy nebo jejímu úplnému uzávěru.

Cílem této diplomové práce bylo popsat expresi jednoho ze signálních proteinů TGF- β receptorové kaskády SMAD 2/3, který by mohl hrát roli i v procesu aterogeneze. Dále bylo zkoumáno, zda jeho expresi ovlivňuje podávání atorvastatinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikroskopická anatomie cév

Základní stavební plán krevních cév, tj. artérií a vén se skládá ze tří vrstev: tunica intima (interna), tunica media a tunica adventicia (externa).

2.1.1 Artérie

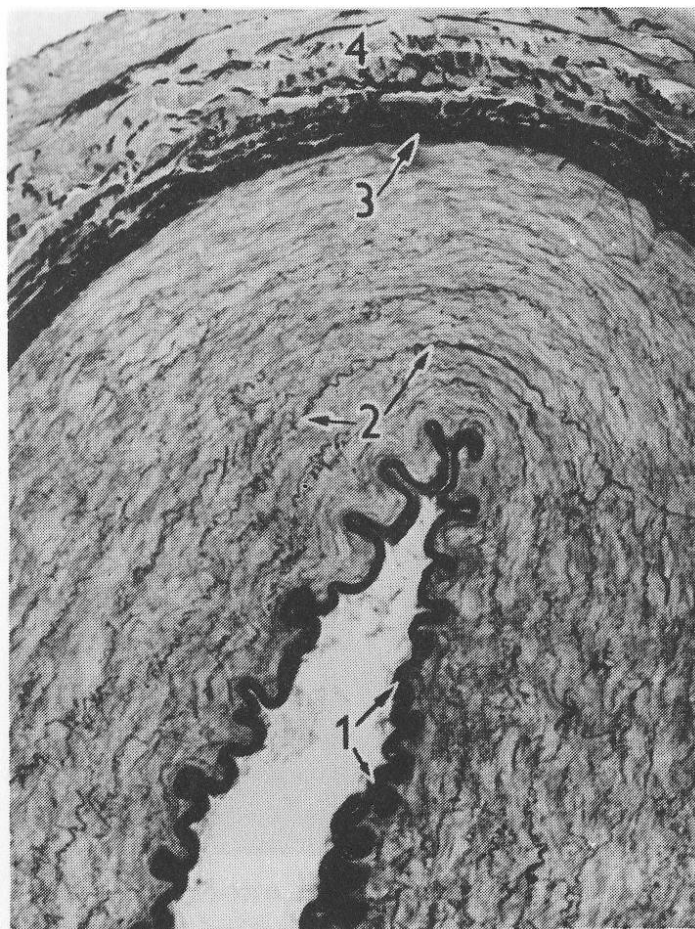
Společným znakem artérií je, že dominantní vrstvou jejich stěny je tunica media, i když se její struktura u jednotlivých typů liší. Podle velikosti se dělí na tři typy:

2.1.1.1 Arterioly

Jsou to cévy, které mají poměrně tlustou stěnu a úzké lumen, jejichž průměr se pohybuje okolo 50-300 μm . Intima je tenká, endotel nasedá na mizivé množství subendotelového vaziva. Membrana elastica interna se skládá z rovnoběžně probíhajících elastických vláken. Media je čistě svalovou, nejvýraznější vrstvou cévy a adventicia je tvořena fibroelastickou vazivovou vrstvou, obvykle tenčí než je media. Kontrakcí nebo dilatací kontrolují přítok krve a krevní tlak v příslušném orgánovém okrsku.

2.1.1.2 Artérie malého a středního kalibru

Stěna těchto cév je poměrně tlustá díky bohatému zastoupení hladkého svalstva v tunica media, hovoříme o artériích svalového typu. Jejich struktura předurčuje jejich funkci, jíž je regulace zásobení příslušné oblasti krví podle funkčních požadavků. Endotel intimy nasedá na tenkou vrstvu subendotelového vaziva. Membrana elastica interna je velmi výrazná s charakteristickými fenestracemi. Media je tvořena až čtyřiceti vrstvami hladkých svalových buněk, většinou cirkulárně uspořádanými a množství elastických vláken kolísá, přičemž ve většině případů tvoří mezi svalovými buňkami síť. Adventicia se skládá z řídkého kolagenního vaziva a vrstvy elastických vláken, která se nachází na rozhraní s medií a někdy vytváří pravou membranu elasticu externu.



Obr.1 Artérie svalového typu člověka, 1- membrana elastica interna, 2-jemná elastická vlákna v tunica media, 3-bohatě zastoupená elastická vlákna na rozhraní tunica media a adventicia, (4) Celoidinový řez. 150 krát [2].

2.1.1.3 Artérie velkého kalibru (např. aorta, truncus pulmonaris)

Do této skupiny patří artérie elastického typu, v jejichž stěně je přítomno velké množství elastinu, který zároveň podmiňuje žluté zbarvení stěny cévy. Stěna je v poměru k objemnému luminu tenká. Intima, dosahující tloušťky až 100 μm , obsahuje polygonální endotelové buňky a subendotelovou vrstvu s kolagenními fibrily, fibroblasty a elastickými vlákny, která ve vnější vrstvě přecházejí do elastických membrán medie. Media obsahuje 40 až 60 elastických, asi 2,5 μm tlustých, koncentricky uspořádaných dírkovaných blanek. Mezi nimi jsou fibroblasty, základní amorfnní hmota, kolagenní fibrily a hladké svalové buňky. Ty jsou oploštělé a rozvětvené a upínají se do elastických membrán. Jako celek tvoří hladké svalstvo oploštělou spirálu. Adventicia je poměrně tenká vazivově elastická vrstva. Obsahuje vasa vasorum, nervová vlákna a brání nadměrnému roztažení medie a intimy při systole.

2.1.2 Vény

Vény podléhají daleko větším individuálním a regionálním rozdílům než artérie. Jejich objem je asi třikrát větší než u artérií, venózní systém má podstatně větší kapacitu než arteriální. Zpravidla sledují průběh artérií, mají větší kalibr a tenčí stěnu.

2.1.2.1 Venuly

Jejich průsvit se pohybuje mezi 0,2-1 mm. Endotel intimy nasedá na tenkou vazivovou subendotelovou vrstvu. Media je tenká, z jedné až tří vrstev hladkosvalových buněk, elastických vláken je málo nebo úplně chybí. Oproti tomu adventicia je poměrně tlustá, složená z longitudinálních kolagenních vláken.

2.1.2.2 Vény malého a středního kalibru

Tato skupina zahrnuje všechny vény kromě hlavních venózních kmenů a jejich přítoků. Průsvit je v rozmezí 1-9 mm. Buňky intimy mají polygonální tvar, subendotelová vrstvička je velmi jemná a množství elastických vláken na rozhraní s medií silně kolísá. Media je ve srovnání s artériemi téhož kalibru tenčí. Hladkosvalové buňky jsou uspořádány do plochých cirkulárních svazečků oddělených kolagenními vlákny a sítěmi vláken elastických. Adventicia je výraznou fibroelastickou vrstvou.

2.1.2.3 Vény velkého kalibru (např. vena cava superior et inferior, vena portae)

Endotelové buňky intimy jsou polygonální, subendotelová vrstva je tlustší než u předešlého typu, mohou v ní být přítomny skupiny hladkých svalových buněk a někdy je přítomna také membrana elastica interna, ale je poměrně tenká. Media je převážně vrstvou vazivově elastickou, je tenká a hladká svalovina je podstatně redukována (např. v dutých žilách) nebo chybí. Nejtlustší z vrstev je adventicia. Objevují se v ní (hlavně v žilách dolní poloviny těla) silné, podélně uspořádané svazky hladké svaloviny, které zabírají nejpodstatnější část této vrstvy.

2.1.3 Kapiláry

Kapiláry mají nejjednodušší stavbu. Jsou to trubice lemované tenkou homogenní cytoplazmou endotelu s plochými jádry, přičemž v kapilárách střední tloušťky stačí k vystlání pouze 2-3 endotelové buňky, u širších se na výstelce podílí větší počet buněk a v úzkých kapilárách dokonce jediná endotelová buňka tvoří úplnou výstelku (např. u myokardu). Endotel také zabraňuje srážení krve a má proliferální schopnost.

Od okolní tkáně jsou odděleny sítí retikulárních vláken a v blízkosti jejich stěny jsou uloženy fibroblasty, makrofágy, nediferencované mezenchymové buňky a pericyty, jimž je přisuzovaná kontraktilní schopnost a tedy možnost regulovat průsvit kapiláry.

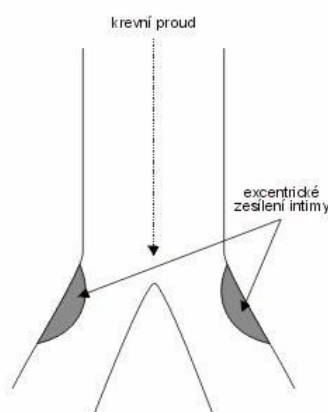
Krevní kapiláry se dělí na typ se souvislou endotelovou výstelkou (např. v mozku, plicích, svalové tkáni) a kapiláry fenestrované (např. v pankreatu, endokrinních žlázách, plexus chorioideus).

Cytoplazma endotelu je prostoupena četnými, 30-60 nm velkými, mikropinocytárními vezikulami, které se otevírají na laminárním i bazálním konci endotelové buňky. Mezibuněčné kontakty jsou zprostředkovány zonulae occludentes, popřípadě interdigitujícími výběžky buněk endotelu.

Prekapiláry jsou umístěny na arteriální straně krevního řečiště, jejich lumen je v průměru široké 12-40 μm , nejmenší z nich se skládají z endotelové trubice a nepočetných hladkosvalových buněk roztroušených vně endotelu. Postkapiláry se nacházejí na venózní straně řečiště, průsvit dosahuje až 200 μm a jejich stěna se skládá z endotelu a roztroušených elementů vazivové tkáně [2].

2.2 Ateroskleróza

Ateroskleróza je chronické degenerativní poškození cévní stěny charakterizované akumulací lipidů, ukládáním vápníku, zánětlivou infiltrací cévní stěny a množением fibrózní tkáně. Etiogeneze aterosklerózy je procesem multifaktoriálním, vzniká jako specifická reakce na nespecifické poškození stěny cév [3]. Ateroskleróza nepostihuje difúzně všechny artérie, jedná se pouze o lokalizovaný proces, přičemž aterosklerotická ložiska mají predilekční místa svého vzniku. Takovými místy jsou především místa větvení velkých artérií, kde nacházíme excentrické adaptivní zesílení intimy. Nejčastějšími místy výskytu jsou: aorta (arcus aortae, horní okraj Valsalvových sinů, ductus arteriosus, místa odstupu velkých krčních artérií), bifurkace břišní aorty, femorální, tibiální a popliteální artérie, epikardiální segmenty koronárních artérií, interní a externí karotidy a cerebrální artérie [4].



Obr.2 Excentrické zesílení intimy v místech větvení arterií, kde se většinou vyvíjejí aterosklerotické léze. Převzato z internetových stránek:

http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_6764.html#11

2.2.1 Rizikové faktory aterosklerózy

Tab.1. Základní rizikové faktory aterosklerózy. Převzato z internetových stránek:

http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_6764.html#11

Modifikovatelné rizikové faktory	Nemodifikovatelné rizikové faktory
Dyslipidemie	věk > 45 let muži, > 55 let ženy
Kouření	dědičnost, rodinná anamnéza
Hypertenze	mužské pohlaví
diabetes mellitus, PGT (porušená glukózová tolerance)	
fyzická inaktivita	
Obezita	

Tab.2. Některé další rizikové faktory aterosklerózy. Převzato z internetových stránek:

http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_6764.html#11

Koagulační rizikové faktory	Jiné rizikové faktory
zvýšený LP(a) a apo(a)	zvýšený homocystein
zvýšený fibrinogen	zvýšený CRP
zvýšený prostacyklin	zvýšený apoB, snížený apoA
zvýšený f. VII, VIII	zvýšený sérový amyloid A
zvýšený PAI-1	zvýšený ferritin

2.2.1.1 Dyslipidemie

Patří k poruchám metabolismu, které vznikají jak na základě dědičné predispozice, tak v důsledku nezdravého životního stylu [5].

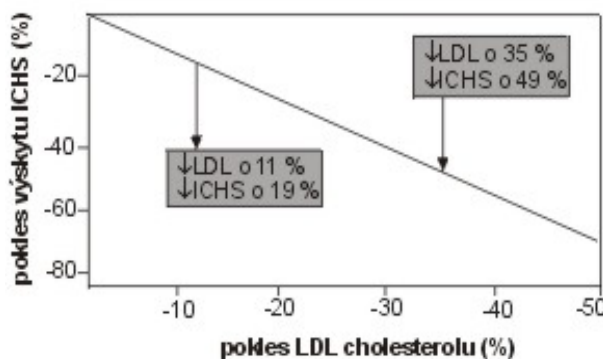
Lipidy jsou důležitým zdrojem energie (triacylglyceroly, resp. volné mastné kyseliny), výchozím materiálem pro stavbu buněčných membrán a syntézu řady látek jako steroidních hormonů, žlučových kyselin, vitamínu D aj. Koncentrace lipidů v plazmě je výsledkem interakce genetických faktorů s faktory zevního prostředí.

Plazma normálně obsahuje <1% chylomikronů, <10% VLDL, zbytek reprezentují LDL a HDL (odtud jejich důležitost). Metabolický osud a eventuelní patogenní působení lipoproteinů je určeno zastoupením apolipoproteinů (apoLP). Ty se podílí na struktuře částice,

jsou kofaktory enzymů lipidového metabolismu a zprostředkují vazbu částice na specifické buněčné receptory. ApoB zajišťuje vazbu na LDL-receptor a receptor pro chylomikronové zbytky, apoC jsou kofaktory lipoproteinové lipázy, apoE ovlivňuje vychytávání lipoproteinových zbytků játry, apoA se podílí na struktuře HDL a jeho vazbě na HDL-receptor a apo(a) je značně homologní s plazminogenem a působí jeho kompetitivní inhibicí. Tedy všechny částice obsahující apoB jsou aterogenní. Stejně tak jsou aterogenní snížené hodnoty apoA a apo(a) zvyšuje riziko trombózy [6].

Hodnota celkového cholesterolu nad 8,5 mmol/l zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění čtyřikrát, přičemž snížení hladiny cholesterolu v krvi o 10% sníží riziko úmrtí na KVCH o 25%. Zvýšení koncentrace TAG o 1 mmol/l zvyšuje riziko koronární příhody o 15% u mužů a o 37% u žen. Normální a doporučené hodnoty lipidů v krvi jsou následující: Do 6 mmol/l celkový cholesterol, do 3 mmol/l LDLcholesterol, do 1,8 mmol/l triglyceridy. Hodnota HDL by měla být vyšší než 1 mmol/l [7].

Graf.1 Pokles výskytu ICHS v závislosti na poklesu hladin LDL cholesterolu. Převzato z internetových stránek: http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_6764.html#11



2.2.1.2 Kouření

Mechanismem účinku kouření je nejen indukce endoteliální dysfunkce (hypoxie endotelu), ale i rozvoj dyslipidemie (nízký HDL, více oxidovaných LDL), hemodynamický stres (tachykardie, přechodný vzestup TK), zvýšení koagulační pohotovosti, relativní hypoxie

(CO redukuje kapacitu hemoglobinu pro kyslík). Snižuje se také tolerance k fyzické zátěži. Ve srovnání s nekuřáky je riziko ICHS u kuřáka zvýšeno 3-5krát [8].

2.2.1.3 Hypertenze

U mužů středního věku s TK nad 160/95 mmHg, je riziko aterosklerotických komplikací 5krát vyšší než u normotenzních osob. Ve věku nad 50 let může mít hypertenze větší prediktivní význam než hypercholesterolémie, přičemž léčbou hypertenze se snižuje riziko KVCH v každém věku.

Cílové hodnoty TK jsou < 140/90 mmHg, u diabetiků <130/85 mmHg [9].

2.2.1.4 Diabetes mellitus a porušená glukózová tolerance

Riziko manifestace komplikací aterosklerózy je u diabetiků přibližně trojnásobné. Až 80% diabetiků umírá na klinické projevy aterosklerózy. Podobně za rizikové považujeme pacienty s PGT.

Příčinou je především vznik glykoxidovaných částic LDL, vznik endoteliální dysfunkce, reakce monocytů na poškození cévního endotelu a vznik pěnových buněk [9].

Přesněji, hyperglykemie způsobuje zvýšenou glykaci proteinů, včetně lipoproteinů LDL, které pak snáze podléhají oxidativní modifikaci. Samy glykované LDL jsou rozpoznávány scavengerovými receptory makrofágů. Je zvýšená produkce superoxidového radikálu, který inaktivuje NO. Navíc u diabetu je tvorba NO snížena, naopak je zvýšená tvorba vazokonstrikčních prostaglandinů a zároveň je narušena endotel-dependentní i independentní vazodilatace. Endotel narušuje i glykovaný albumin. Je snížena syntéza prostacyklinu, zvýšená tvorba PAI-1 i tvorba cytoadhezivních molekul (selektin P, selektin E, ICAM-1) [10].

Vysoké riziko u diabetiků není dáno jen vlivem hyperglykemie (glykace) na lipoproteiny a na cévní endotel, ale také vysokým současným výskytem hypertenze, dyslipidemie a obezity.

2.2.1.5 Obezita, tělesná inaktivita

Obezita je definována jako nadbytek tělesného tuku, vyjádřeno pomocí BMI je to více než 30 kg/m^2 . Obezita pravděpodobně ovlivňuje i jiné rizikové faktory v různém stupni individuálně, navíc v některých případech lze považovat vznik dalších faktorů za komplikace obezity či důsledek nevhodného životního stylu. Např. zvýšení kyseliny močové, porucha metabolismu cukrů, poruchy vylučování sodíku z organismu jdou ruku v ruce s obezitou, i když se tyto příznaky mohou vyskytovat i jako samostatné choroby [11].

Vzestup hmotnosti o 10 kg vede k zvýšení TK o 6,5 mmHg, cholesterolu o 0,3 mmol/l a lačné glykémie o 0,1 mmol/l. Obezita výrazně akceleruje aterosklerózu především u osob do věku 50 let [12].

Nízké hladiny HDL cholesterolu jsou často nacházeny u kuřáků a obézních osob. Naopak vysoké hladiny HDL cholesterolu jsou nacházeny v některých dlouhověkových rodinách, kde se předčasná ateroskleróza nevyskytuje. Vyšší hladiny HDL cholesterolu byly také popsány u osob s vysokou tělesnou aktivitou [12].

Pohyb pomáhá snižovat tělesnou váhu, zlepšuje profil tuků v krvi a snižuje náchylnost k tvorbě krevních sraženin.

2.2.1.6 Pohlaví a věk

Věk je nezávislý rizikový faktor manifestace aterosklerózy. Obecně se považuje za rizikový věk u mužů nad 45 let, u žen věk nad 55 let [13]. Rozdíl je dán protektivními účinky ženských pohlavních hormonů. Estrogeny zvyšují počet receptorů pro LDL cholesterol na hepatocytech a tím podporují jeho katabolismus a vylučování. Současně snižují zastoupení receptorů pro HDL cholesterol a snižují aktivitu jaterní lipázy, která štěpí HDL cholesterol. Těmito mechanismy estrogeny zvyšují koncentraci HDL cholesterolu a snižují koncentraci LDL cholesterolu a celkového cholesterolu.

Významným prokázaným účinkem estrogenů je působení na endotel a na hladkou svalovinu cévní stěny. Estrogeny působí vazodilatačně na periferní cévy, na koronární arterie, a dokonce i na cévy ateroskleroticky změněné.

Na vazodilatačním účinku se podílí celá řada mechanismů: podpora tvorby prostacyklinu a oxidu dusnatého, zvýšení senzitivity β -adrenergních receptorů, snížení citlivosti cévní stěny k působení endotelinu a dalších vazoaktivních působků, inhibice kontraktility hladké svaloviny cévní stěny [14].

2.2.1.7 Dědičné predispozice

Genetická predispozice pro aterosklerózu je evidentní. Každý jedinec nese určitou genetickou zátěž, k ateroskleróze se vztahuje celá řada genů. V některých rodinách lze určit spojitost onemocnění s jediným, tzv. majoritním genem (monogenní onemocnění) - příkladem je familiární hypercholesterolemie (FH). U většiny dalších případů má vliv na predispozici k ateroskleróze jedna nebo více variací tzv. minoritních genů (multigenní onemocnění) - např. gen pro lipoproteinovou lipázu. Ačkoli je zřejmé, že mutace na tomto genu ovlivňují hladiny lipoproteinů, rozvoj onemocnění je závislý především na vnějších podmínkách [15].

Rizikové faktory jako je hypertenze a diabetes mellitus jsou rovněž geneticky podmíněné, na obezitě se do určité míry dědičnost podílí také.

2.2.1.8 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein (CRP) je vysoce senzitivní marker zánětu (ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění). Je součástí nespecifického imunitního obranného systému, tzv. reakce akutní fáze, kde má funkci jako opsonin v leukocytové fagocytóze a aktivaci makrofágů. Jeho plazmatická hladina se zvyšuje u všech druhů zánětlivých procesů bez ohledu na etiologii [7].

Rizikové pacienty ukáže buď zvýšená hladina cholesterolu, nebo zvýšená koncentrace CRP. Vůbec nejohroženější jsou jedinci se zvýšenou plazmatickou koncentrací obou faktorů současně.

Soustavný výzkum CRP také zjistil, že koncentrace CRP v plazmě korelují i s jinými rizikovými stavy. Základní hodnoty CRP jsou těsně spojeny s hodnotami BMI. Jsou zvýšené při obezitě, ale také při diabetu typu 2, glukózové intoleranci a metabolickém syndromu. Zvýšenou koncentraci CRP mají i kuřáci a konzumenti alkoholu [7].

2.2.2 Teorie vzniku aterosklerózy

V minulosti existovaly dvě hlavní teorie vzniku aterosklerózy: teorie lipidová a teorie endoteliálního poškození, které byly později spojeny do tzv. „sjednocené hypotézy aterosklerózy“. V současné době se dostává do popředí zájmu infekční teorie aterosklerózy. Všechny tyto teorie mají mnoho společných rysů a do značné míry se prolínají. Velký význam v rozvoji aterosklerózy mají ale také fyzikální faktory, které rozhodují především o lokalizaci aterosklerotického ložiska [3].

2.2.2.1 Lipidová teorie

Tato teorie předpokládá, že primární příčinou aterosklerózy je akumulace lipidů v cévním endotelu, jejichž zvýšený průnik je dán především jejich zvýšenou koncentrací v krvi. Dochází k nadměrné akumulaci lipidů intracelulárně a k přeměně makrofágů a hladkých svalových buněk na pěnivé buňky jako základ aterosklerotického ložiska [16].

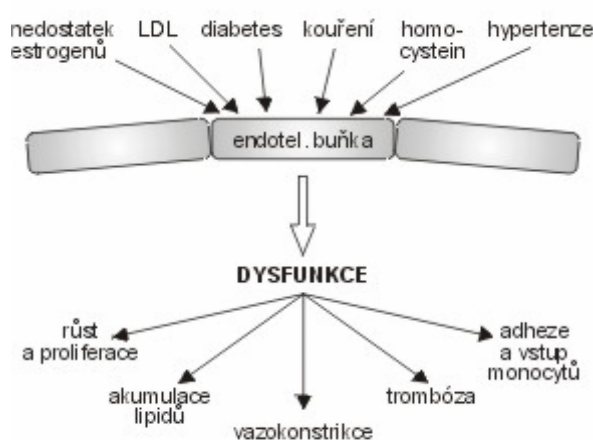
2.2.2.2 Teorie endoteliálního poškození

Tato Rossova teorie předpokládá, že prvotní příčinou rozvoje aterosklerózy je poškození cévního endotelu. Na něj adherují trombocyty, které uvolňují řadu faktorů a které stimulují proliferaci hladkých svalových buněk a syntézu extracelulární matrix. Ukládání lipidů do aterosklerotického ložiska je podle této teorie záležitostí sekundární [1].

2.2.2.3 Sjednocená teorie aterosklerózy

Sjednocená teorie aterosklerózy neboli teorie endoteliální dysfunkce, vychází z předpokladu, že základním krokem v rozvoji aterosklerózy je lokalizované poškození endotelu, kdy není porušena jeho integrita, ale jsou alterovány jeho funkce a endoteliální buňky mají zvýšený obrát a zvýšenou propustnost pro některé molekuly. Vzniká nerovnováha mezi vazoaktivními mechanizmy (vazokonstrikční × vazodilatační) a hemokoagulačními působky (prokoagulační, protrombotické × antikoagulační, antitrombotické). Výsledkem je převaha vazokonstrikčních a protrombotických pochodů a aktivace zánětlivých a proliferačních

dějů. Dochází mimo jiné ke zvýšené adhezenci trombocytů a jejich agregaci se zvýšeným uvolňováním růstových a proliferačních faktorů. Chemotaktické faktory přitahují další monocyty, které se transformují v makrofágy. Lipoproteiny snáze pronikají poškozeným endotelem do subendoteliálních prostor a masivně infiltrují cévní stěnu, kde jsou oxidovány. Oxidované lipoproteiny dále aktivují makrofágy a proces aterosklerózy progreduje. Rozvoje aterogeneze se účastní prakticky všechny elementy cévního endotelu: buňky hladké svaloviny, monocyty (makrofágy), trombocyty a T-lymfocyty. Na konci těchto pochodů je pak fibro-ateromová léze, ruptura, či fisurace plátu s nasedající trombózou a obliterací postižené arterie [3].

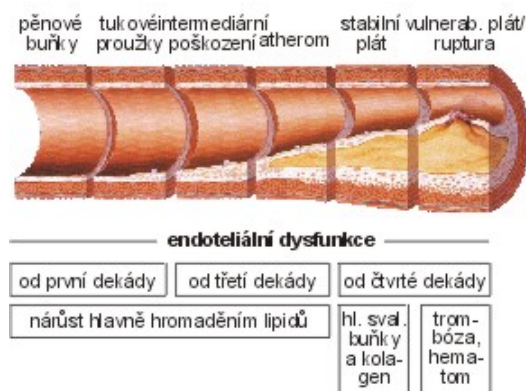


Obr.3 Endoteliální dysfunkce, hlavní příčiny a důsledky. Převzato z internetových stránek: http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_6764.html#11

2.2.2.4 Infekční teorie aterosklerózy

Ateroskleróza je chronický zánětlivý proces a velkou roli v něm hraje nepochybně imunitní systém. Infekční teorie aterosklerózy předpokládá, že základním etiologickým agens vyvolávajícím endoteliální dysfunkci a zánětlivou reakci v cévní stěně jsou chronické bakteriální a virové infekce. Ukázalo se, že zvýšená koncentrace C-reaktivního proteinu (CRP) jako indikátoru probíhající infekce je nezávislým rizikovým prognostickým faktorem aterosklerózy. Za možné etiologické agens jsou považovány především Chlamydia pneumoniae a Cytomegalovirus, dále pak Helicobacter pylori, herpetické viry a další [17].

2.2.3 Aterogeneze, vývojové stupně aterosklerózy



Obr.4 Vývoj aterosklerózy. Převzato z internetových stránek:
http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_6764.html#113

Jak již bylo zmíněno, díky změně permeability a zvýšené expresi buněčných adhezních molekul, akumulují se v intimě lipoproteinové částice, které spouštějí další specifické buněčné reakce. Tyto samé lipoproteiny jsou zde přítomny i za normálních okolností, avšak v nižší koncentraci. Prahová koncentrace indukující jejich kumulaci a patologickou buněčnou reakci je neznámá.

Následuje modifikace těchto lipoproteinů, především jejich oxidace. Oxidované částice mohou pak být vychytávány makrofágy nebo hladkosvalovými buňkami vazbou na lipoproteinové nebo tzv. scavengerové receptory. Endocytované lipidy jsou zpravidla rozloženy a reesterifikovány pro uložení. Příjem OxLDL pomocí scavengerových receptorů není zpětnovazebně regulován a díky zvýšené kumulaci vznikají tzv. *pěnové buňky*, které představují iniciační fázi aterosklerózy, neboli léze typu I. Ty představují prvně mikroskopicky i chemicky detekovatelná depozita za minimálních pozorovatelných změn v intimě. Vyskytují se nejčastěji u dětí, ale mohou být nalezeny i u dospělých (u jedinců s nepatrnou aterosklerózou nebo v oblastech cév resistantních vůči ateroskleróze) [18].

Vrstvením pěnových buněk do přiléhajících vrstev vzniká další stupeň lézí, tzv. *tukové proužky* („fatty streaks“). Jsou makroskopicky viditelné a obsahují více buněk hladkého svalstva než předchozí typ, dále také T-lymfocyty nebo mastocyty. Hlavní složkou lipidových částic jsou estery cholesterolu (77%) a fosfolipidy, a jejich kapénky jsou dispergované i v mezibuněčném prostoru. Jestli se léze typu II vyvíjejí a jestli jsou progresi podléhající nebo resistantní je velkou měrou určeno mechanickými silami působícími na příslušnou část

cévní stěny. Nízké smykové napětí zvyšuje dobu interakce mezi stěnou cévy a krví nesenými částicemi, z čehož plyne i zvýšení transendoteliální difúze. V místech turbulentního proudění (ohyby a větvení cév) krev naráží na zevní okraje stěny arterie a mechanicky ji poškozuje. Zde je intima ztlustěna a pokročilé aterosklerotické léze se vyvíjí z tukových proužků často právě v těchto místech adaptivního zesílení intimy [19].

Chemický a morfologický most mezi typem II a ateromem představují léze typu III neboli *léze intermediární* či *preaterom*. Jejich charakteristickým histologickým znakem jsou četná lipidová jezírka („pools“), která leží pod vrstvou makrofágů a pěnových buněk a oddělují od sebe strukturní buňky hladkého svalstva. Četné studie ukazují, že lipidové jádro, charakteristická součást pokročilých lézí - tedy dalšího vývojového stupně, se utváří přibýváním a sléváním těchto extracelulárních poolů.

Typ IV, známý také jako *aterom*, je lokalizován v místech excentrického adaptivního ztlustění intimy, tedy je zpočátku excentrickou lézí. Lipidová jádra rozšiřují stěnu cévy a jsou většinou dost velká, aby byla v rovině řezu léze viditelná pouhým okem. Přesto však často aterom není příčinou zúžení lumen. Měření ukazují, že excentrický vznik fibrózních plátů způsobuje, že zbývající zdravá cévní část se při průchodu pulzních vln více dilatuje. Tím je zachován lumen cévy i průtok krve, i když je přítomen aterosklerotický plát. Zvětšuje se šíře cévní stěny, většinou excentricky – tzv. remodelace. Hladkosvalové buňky rozehnané lipidovým jádrem mají ztenčená a prodloužená těla a mohou mít neobvykle silnou bazální membránu. Některé jejich organely mohou být kalcifikovány [20].

Pokud se lipidové jádro pokryje *fibrózní tkání*, stává se lézí typu V. Tato situace představuje podtyp Va. Nová tkáň se skládá z kolagenu a hladkosvalových buněk, může obsahovat i zbytky včleněných trombů. Tyto léze mohou být vícevrstevné, kde několik lipidových jader oddělených silnými vrstvami fibrózní spojovací tkáně je nepravidelně navrstveno na sebe. Tato morfologie je také nazývána termínem vícevrstevný fibroaterom. Dalším podtypem je Vb, kde je hlavním znakem mineralizace. Depozita kalcia mohou nahradit akumulované zbytky mrtvých buněk, extracelulárních lipidů i veškerých jader a zesilují fibrózní tkáň. V dolních končetinách je patrný podtyp Vc. Zde je intima nahrazena a zesílena vazivovou spojovací tkání, lipidové jádro chybí a depozitovaný tuk je minimální. Tyto fibrotické léze jsou výsledkem více procesů, včetně organizování trombu, rozšíření fibrózních složek sousedního fibroateromu, resorpce lipidových jader. Obecně mají léze typu V obliterovanou intimu, při okraji jádra jsou kapiláry, které mohou být i v nově utvořené tkáni

a mohou být zdrojem mikrokrvácení. Okraje pokročilých lézí jsou díky hojnému počtu makrofágů náchylné k rupturám. Medie a sousedící adventicie mohou obsahovat shluky lymfocytů, makrofágů a pěnových buněk [20].

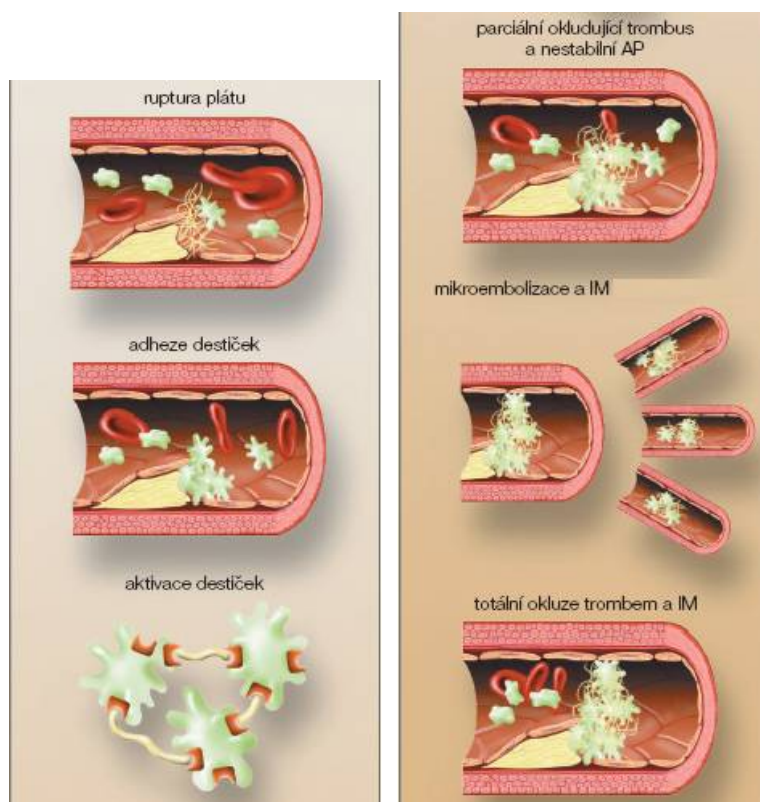
Mortalita v důsledku aterosklerózy je zapříčiněna tzv. *komplikovanými lézemi*, které zároveň představují poslední vývojový typ, tedy typ VI. Typ IV nebo V s jedním nebo více dodatečnými znaky, jsou klasifikovány jako typ VI. Podle superponovaných rysů se typ VI dále dělí na VIa charakterizovaný rupturami povrchu, VIb s přítomností hematomu nebo krvácení a trombóza je přítomna u VIc. Podtyp VIabc jeví všechny tři znaky. Komplikující rysy se vyskytují jako následek individuálních rozdílů v rizikových faktorech a reakcí tkáně [21].

Defekty povrchu léze zahrnují fisury a ulcerace. Nejmenší ulcerace jsou způsobeny ložiskovým úbytkem části buněk endoteliální vrstvy a jsou viditelné pouze mikroskopem, zatímco hluboké ulcerace mohou odhalit a uvolnit lipidy z lipidového jádra. Fisury nebo trhliny povrchu léze jsou různé délky a hloubky, přičemž fisury se pravděpodobně znovu uzavírají včleňováním hematomů a trombů do léze. Faktory usnadňující rozvrat intimy jsou přítomnost zánětlivých buněk, uvolňování toxických látek a proteolytických enzymů makrofágy, koronární spasmus, strukturální chatrnost spojená s kompozicí léze, smykové napětí. Hematomy jsou obvykle způsobeny trhlinami povrchu léze, některé jsou důsledkem krvácení z nově vzniklých cév uvnitř léze [22].

Od 4. dekády života jsou časté léze obsahující tromby nebo jejich zbytky. Fisury a hematomy, které jsou základem trombotických usazenin se objevují opakovaně a tromby se tímto mnohokrát přetvářejí. Opakovaným včleňováním hematomů a trombů do léze vede k postupnému zužování lumen. Některé středně velké cévy se mohou uzavřít během několika dní nebo hodin. Díky negativnímu vlivu na trombocyty je trombóza podporována také vysokými hladinami LDLs.

Destičky pacientů s primární hypercholesterolémií vykazují zvýšenou adhezi, agregaci a sekreci. U kuřáků je hladina plasmatického fibrinogenu vyšší než u nekuřáků. Protromboticky působí díky své podobnosti plasminogenu také LP(a). Trombotická depozita, která nejsou okluzivní a nejsou rozložena uvádějí do chodu mechanismy přispívající k relativně permanentnímu ztlušťování léze. Lokální produkce cytokinů a růstových faktorů stimuluje změny ve fenotypu hladkosvalových buněk, zvyšuje se proliferace, migrace

a syntéza kolagenu, což vede v organizaci trombotických depozit. Cytokiny a mitogeny, které zprostředkovávají tuto odpověď jsou uvolňovány z trombocytů a leukocytů přiléhajících k odkrytým subendoteliálním strukturám porušené cévní stěny. Tyto autokrinní mechanismy jsou více patrné za podmínek hyperlipidémie [23].



Obr.5 Patogeneze akutních koronárních syndromů. Převzato z internetových stránek: <http://www.remedia.cz/clanek.php?unit=2845&parent=100001&action>

2.2.4 Transformující růstový faktor β (TGF- β)

TGF- β je cytokin zapojený do celé řady různých, avšak často protichůdných dějů. Je důležitý jak pro fyziologické (embryonální vývoj, buněčná diferenciace a buněčný růst), tak i patologické procesy (zánět, fibróza, kancerogeneze).

Jeho vliv na kardiovaskulární systém (KVS) je také dvojznačný. Na jedné straně je tu teorie, kde působí jako ochranný cytokin. Představuje antisklerotický a plát stabilizující faktor, má vliv na regulaci zánětu a také profibrotické a reparativní účinky. Na druhé straně hraje roli v nepříznivé postangioplastické restenóze, remodelaci myokardu po infarktu myokardu nebo remodelaci cévní stěny [24].

Rodina TGF zahrnuje množství různých proteinů: TGF- β 1, TGF- β 2 (exprimovaný hlavně v CNS, neexprimovaný v KVS), TGF- β 3 (malá exprese v KVS), aktiviny a několik kostních morfogenetických proteinů (BMP).

Vlivy na kardiovaskulární systém jsou přičítány isoformě TGF- β 1. V procesu aterogeneze ovlivňuje aktivaci T-lymfocytů a makrofágů a proliferaci hladkosvalových buněk cévní stěny, konkrétně působí protizánětlivě a antiproliferativně. Snížená produkce nebo aktivita TGF- β 1 vede k destabilizaci plátu [25].

2.2.5 SMAD

Součástí TGF- β je skupina polypeptidů, které mají rozmanitý vliv na růst a diferenciaci buňky, depozita v matrix a modulaci imunity.

SMAD (Small Mothers Anti Decapentaplegic) je třída intracelulárních proteinů podílejících se na transdukci signálu z TGF lidandů.

Rozlišujeme 3 podskupiny SMADů: tzv. receptory regulované - R-SMADs, (SMAD 1,2,3,5 a 9), kooperační - co-SMAD (SMAD 4) a inhibiční - I-SMADs (SMAD 6,7). SMAD 2 a 3 jsou aktivovány jako odpověď na TGF nebo aktiviny, SMAD 1, 5 a 9 odpovídají na signály BMP [26].

Po vazbě TGF- β na transmembránový receptor (TGF- β R) dochází k fosforylaci SMADU 2 nebo 3, což umožňuje jeho vazbu na SMAD 4. Tato vazba je důležitá pro přechod z cytoplazmy do jádra, kde potom přímo ovlivňují genovou transkripci [27].

Tab.3. Funkce SMAD 2 v cévních/imunitních buňkách [26].

<i>Ligand</i>	<i>TGF-βs, aktiviny</i>
<i>knockout fenotyp</i>	<i>úmrtí v časném těhotenství, defektní tvorba extraembryonálního ektodermu a mesodermu, nevyvinutá předozadní osa</i>
<i>funkce, vaskulární obraz</i>	<i>inhibice cytokiny aktivované exprese E-selectinu, indukce endoteliální syntézy NO</i>

Tab.4. Funkce SMAD 3 v cévních/imunitních buňkách [26].

ligand	TGF- β s, aktiviny
knockout fenotyp	myši se rodí živé, zhoršená slizniční imunita a schopnost T -lymfocytů reagovat na TGF- β 1, v závislosti na ostatních genech některé myši umírají mezi 1.-10. měsícem života, mohou mít vady kostry, osteoporózu, rakovinu tlustého střeva, intenzivní hojení ran, snížená reaktivita makrofágů na TGF- β
funkce, vaskulární obraz	u SMAD 3 deficitních makrofágů a hladkosvalových buněk je inhibice TGF- β 1 cytokiny idunkované aktivace blokována, koronární cévy dárcovského srdce transplantovaného do Smad 3 deficientní myši vyvíjí zrychleně transplantační cévní nemoc, exprese je snížena v aterosklerotickém plátu



Obr.6 Struktura fosforylovaného komplexu SMAD3SMAD4. Převzato z internetových stránek: [http://en.wikipedia.org/wiki/SMAD_\(protein\)](http://en.wikipedia.org/wiki/SMAD_(protein))

2.3 Statiny

Statiny dnes představují jednu z nejpoužívanějších skupin léků. Bylo prokázáno, že snižují významně nejen cholesterol, ale jako jediná hypolipidemika také mortalitu a morbiditu na kardiovaskulární nemoci [28].

2.3.1 Mechanismus účinku

Statiny zasahují do endogenní syntézy cholesterolu na úrovni inhibice jejího klíčového enzymu hydroxymethylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy, tzn., že β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA nemůže být redukován na mevalonát [29].

Tento enzym je lokalizován v hladkém endoplazmatickém retikulu jaterních buněk. Jeho inhibice způsobí snížení syntézy cholesterolu, což vyvolá zmnožení LDL-receptorů hepatocytů a zvýšené vychytávání cholesterolu z krve. Tak se jednak sníží produkce a zároveň zvýší eliminace LDL částic, přičemž pokles dosahuje až 40%. Zároveň obvykle mírně stoupne koncentrace HDL (až o 15%) a triglyceridy klesají také (až o 25%) [28].

Tab.5. Seznam statinů dostupných v současné a brzké době na našem trhu. Převzato z internetových stránek: <http://www.solen.cz/pdfs/med/2004/01/08.pdf>

	lovastatin	simvastatin	pravastatin	fluvastatin	atorvastatin	cerivastatin	rosuvastatin
Statiny dostupné	apo-Lovastatin	simgal	lipostat	lescol	sortis		crestor
	holetar	simvacard		lescol XL	atoris		
	medostatin	simvor			torvacard		
	mevacor	vasilip			tulip		
		zocor			triglyx		
Statiny dostupné v brzké době („superstatiny“)	pitavastatin						

Statiny jsou látky vzájemně si podobné z pohledu farmakodynamiky, rozdíly však nacházíme v chemických a farmakokinetických vlastnostech. První na trh uvedené inhibitory lovastatin a simvastatin jsou proléčiva, ze kterých se po perorálním podání tvoří vlastní účinná látka otevřením laktonového kruhu. Pravastatin a další novější farmaka jsou již

účinnou látkou. Zatímco dosud jmenovaná léčiva jsou mikrobiálního původu, fluvastatin, atorvastatin a cerivastatin jsou látky syntetické [30].

Lovastatin, simvastatin, atorvastatin a cerivastatin jsou spíše lipofilní a jsou metabolizovány hepatálním cytochromem P450, a to zejména jeho izoenzymem CYP3A4. Pravastatin a fluvastatin jsou více hydrofilní, pravastatin prakticky není metabolizován tímto cytochromem a je vylučován ledvinami, fluvastatin je sice částečně odbouráván cytochromem 3A4, ale na jeho metabolismu se podílejí i jiné izoenzymy. Fluvastatin, lovastatin a simvastatin se silně vážou na plazmatické proteiny. Těmito vlastnostmi je vyvolána řada lékových interakcí [31].

Statiny patří mezi velmi dobře snášená léčiva. K nejčastějším nežádoucím účinkům patří mírné a přechodné gastrointestinální obtíže, bolesti hlavy, někdy bývá pozorováno dočasné zvýšení jaterních aminotransferáz. Potenciálně nejzávažnější a ve výjimečných případech život ohrožující komplikací terapie statiny je postižení kosterního svalstva ve formě myopatie až rabdomyolýzy. Při rabdomyolýze dochází k poruše integrity sarkolemy myocytů s následným vyplavením velkého množství myoglobinu do cirkulace. Jeho ukládání v ledvinových tubulech může zapříčinit rozvoj akutního renálního selhání [32].

Užívání cerivastatinu bylo zastaveno v srpnu roku 2001 z důvodu výskytu několika desítek případů rabdomyolýzy, z nichž několik skončilo fatálně.

2.3.2 Nelipidové (pleiotropní) účinky statinů

Práce publikované v poslední době naznačují, že redukce plazmatických hladin lipidů není zřejmě jediným důvodem výrazného klinického prospěchu z podávání statinů. Bylo zjištěno, že pacienti léčení statiny měli významně nižší riziko koronárních příhod, než pacienti léčení jinými hypolipidemiky i přes srovnatelný pokles sérové hladiny cholesterolu. Navíc snížení kardiovaskulární mortality a morbidity účinkem statinů se v klinických studiích manifestovalo již během prvních dvou let terapie, což je dlouho předtím, než je prokazatelná regrese aterosklerotických plátů. Ke klinickému prospěchu z léčby statiny tedy zřejmě přispívají jejich extralipidové účinky, které nejsou závislé na snížení koncentrace LDL cholesterolu [33].

Blokáda přeměny HMG-CoA na mevalonát je zřejmě zásadní i pro většinu extralipidových účinků. Mevalonát je prekurzorem nejen při syntéze cholesterolu, ale i dalších látek ovlivňujících buněčnou aktivitu a metabolismus jako jsou hem A, dolichol, ubiquinon, a isoprenoidní deriváty farnesylpyrofosfát (FPP) a geranylgeranylpyrofosfát (GGPP). Tyto deriváty svou isoprenylací aktivují signální proteiny ze skupiny Ras a Rho zodpovídající za přenos signálu z buněčných receptorů např. pro insulin, PDGF (destičkový růstový faktor), cytokiny nebo angiotenzin II [34].

Mezi významné extralipidové účinky patří ovlivnění zánětlivé reakce, endoteliální dysfunkce, tvorby trombů, stability plátů, inzulinové rezistence a kostní formace, což jsou mechanismy a procesy uplatňující se v patofyziologii aterosklerózy, ischemické cévní mozkové příhody, demence, diabetes mellitus nebo osteoporózy.

Protizánětlivé účinky statinů se projevují hlavně snížením hladin CRP, inhibicí interakce mezi endotelovými buňkami a leukocyty, snížením exprese adhezních molekul a tedy snížením počtu zánětlivých buněk v aterosklerotickém plátu.

Mechanismus, kterým statiny zlepšují stav *endoteliální dysfunkce* spočívá v jejich schopnosti zvyšovat expresi a aktivitu endoteliální NO syntézy (eNOS). Dochází zde k ovlivnění posttranskripčních a posttranslačních dějů, zatímco genová transkripce eNOS zvýšena není.

Inhibice isoprenylace signálních proteinů Ras a Rho vede také ke snížené syntéze DNA v hladkosvalových buňkách i plátech, což je důvodem *snížené proliferace buněk hladkého svalů*. Tento pozitivní vliv je vlastní lipofilním zástupcům statinů [33].

Princip *stabilizace plátu* spočívá v schopnosti statinů redukovat hladiny lipidů, inhibovat jejich oxidaci, snižovat zánět, buněčnou smrt, syntézu metaloproteináz (způsobují oslabení fibrózní čepičky) a obsah kolagenu v plátu.

Pleiotropní účinky statinů hrají roli i v rozvoji *inzulinové rezistence* a následné klinické manifestaci *diabetu mellitu (DM) typu 2*. Inzulínová rezistence (IR) je důsledkem snížené schopnosti periferních tkání reagovat na cirkulující inzulín, což se projevuje omezeným vstupem glukózy do buněk a kompenzační hyperinzulinémií. Obezita spojená se zvýšenými hladinami volných mastných kyselin je jeden ze základních rizikových faktorů IR a DM 2 [35].

VMK snižují periferní utilizaci glukózy zásahem do inzulinové signální funkce v kosterním svalu, tedy snížení hladin triglyceridů statiny (např. pravastatin o 12%) vede k opětovnému posunu od VMK ke glukóze jako hlavnímu zdroji energie a tím ke zlepšení IR. Adipocyty produkující velké množství prozánětlivých cytokinů jako je TNF- α nebo IL-6 ovlivňujících funkci inzulinového receptoru, snižujících inzulinovou aktivitu a inhibujících inzulinovou sekreci. Výše popsané protizánětlivé vlastnosti statinů mohou tedy zpomalit vývoj IR.

Významným činitelem v patofyziologii *Alzheimerovy choroby* je β -amyloid, peptid, který se akumuluje v mozku, působí neurotoxicky a způsobuje neurodegeneraci. Podávání lovastatinu a simvastatinu bylo v experimentálních studiích spojeno s intracelulárním i extracelulárním snížením hladin β -amyloidu. Předpokládá se, že tento vliv je způsoben snížením obsahu cholesterolu v buněčných membránách (vysoký obsah membránového cholesterolu vede k přeměně amyloidního prekursorového proteinu cestou β/γ - sekretázy, naopak nízký pomocí α -sekretázy) [36].

2.3.3 Atorvastatin

Atorvastatin je celosvětově nejprodávanějším hypolipidemikem a jeho klinická účinnost byla předmětem hodnocení celé plejády preklinických i klinických intervenčních studií [35].

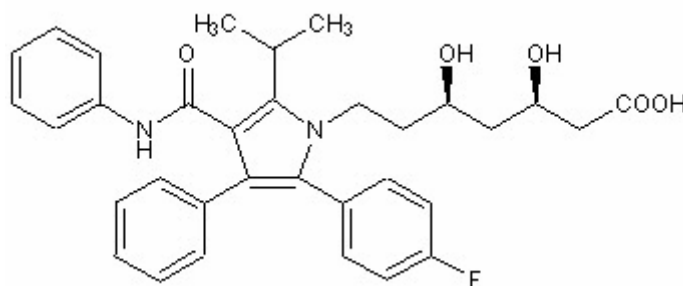
Je to představitel III. generace statinů, který nejvýznamněji snižuje celkový a LDL cholesterol, a to o 28-42% u celkového a o 38-54% u LDL cholesterolu v závislosti na podávané dávce (10, 20, 40, 80 mg). Současně dochází také k poklesu hladin triglyceridů (o 34%) a vzrůstu prospěšného HDL cholesterolu (o 5,5%). Indikován je u nemocných s izolovanou hypercholesterolémií nebo kombinovanou hyperlipoproteinémií s převahou hypercholesterolémie a jen mírným zvýšením triglyceridů. Obvyklá denní dávka atorvastatinu je 10 mg, úprava dávkování se provádí s odstupem 4 týdnů podle výsledků LDL cholesterolu v krevním séru. Maximální denní dávka je 80 mg. Kromě monoterapie je využíván i v kombinační terapii s fibráty, pryskyřicemi, dále antihypertenzivy a lze předpokládat využití kombinace s inhibitory vstřebávání cholesterolu, tedy ezetimibem.

2.3.3.1 Farmakokinetika

Po perorálním podání je atorvastatin absorbován z 30% a dále podléhá významnému first-pass efektu v játrech, takže jeho biologická dostupnost je asi 14%. Z 98% je vázán na plazmatické bílkoviny a čas dosažení maximální plazmatické koncentrace je 60 min. Cytochromem P450 3A4 je metabolizován na ortho- a parahydroxylované metabolity, které jsou zodpovědné za inhibiční vliv na HMG-CoA reductázu. Atorvastatin i jeho aktivní metabolity jsou vylučovány převážně žlučí [11].

2.3.3.2 Nežádoucí účinky

Při studii nežádoucích účinků přerušilo léčbu 3% pacientů. Nejčastěji uváděné nežádoucí účinky se týkaly gastrointestinálního traktu. Výskyt myalgií byl obecně nízký a představoval 1,9%, případ rabdomyolýzy se nevyskytl. Výskyt myopatií je spojován hlavně se současným užíváním jiných léčiv, která jsou kompetitory o isoenzym CYP 3A4. Koncentrace statinu v séru se pak může zvýšit až dvacetinásobně [37].



Obr.7 Chemický strukturní vzorec atorvastatinu, chemicky 7-[3-fenyl-4-fenylkarbamoyl-2-fluorfenyl-5-(2-propyl) pyrrol-1-yl]-(2R,4R)-2,4-dihydroxyheptanová kyselina

Tab.6. Léky, s jejichž kombinací je riziko myopatie vyšší (výčet není úplný, řada dalších léků je metabolizována cytochromy).

<i>Hypolipidemika</i>	<i>Imunosupresiva</i>	<i>Antibiotika</i>	<i>Antimykotika</i>	<i>Blokátory kalciového kanálu</i>
fibráty (gemfibrozil)	cyclosporin	erythromycin	ketokonazol	diltiazem
niacin	prednison	azithromycin	itrakonazol	verapamil
		clarythromycin	flukonazol	
<i>Inhibitory proteáz</i>	<i>Antiarytmika</i>	<i>Jiné</i>	<i>Grapefruitový džus</i>	
indinavir	digoxin	H2 blokátory (cimetidin)		
	amiodaron	warfarin		
		sildenafil		

Tab.7. Výsledky studie Greace, průměrná dávka atorvastatinu 24 mg. Převzato z internetových stránek: <http://www.remedia.cz/pdf/20060415104037lekpro3-2-04.pdf>

<i>Ovlivňované faktory</i>	<i>Změna</i>
celkový cholesterol	-36%
LDL cholesterol	-46%
triglyceridy	-31%
HDL cholesterol	+7%
celková mortalita	-43%
koronární mortalita	-47%
nefatální infarkt myokardu	-59%
nestabilní angina pectoris	-52%
srdeční selhání	-50%
koronární angioplastika/bypass	-51%
cévní mozková příhoda	-47%

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit a popsat expresi SMAD 2/3 v aterosklerotických plátech u apoE/LDL-receptor deficičních myší. Dalším úkolem byla studie ovlivnitelnosti těchto proteinů podáváním atorvastatinu.

3.2 Experimentální část

Samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru, vážící 15-20 gramů, byly zakoupeny v Taconic Europe (Dánsko) a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

3.2.1 Zvířata a předepsaná dieta

U všech myší byl zahájen výkrm experimentálními dietami ve věku 8 týdnů. Zvířata byla náhodně rozdělena do 2 skupin. Kontrolní, které byla podávána pouze aterogenní dieta a atorvastatinové, které byla podávána aterogenní dieta obohacena o 100 mg atorvastatinu na 1kg váhy denně.

Aterogenní dieta (Western type diet) obsahovala 21 % tuku (11 % nasycených mastných kyselin) a 0,15 % cholesterolu.

Obě skupiny byly krmeny experimentálními dietami po dobu 8 týdnů. Každá z myší byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6 g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vyláčněna a bylo provedeno usmrcení předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C.

3.2.2 Biochemická analýza

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na gerontologické a metabolické klinice Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při

540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

3.2.3 Imunohistochemie

Veškerá imunohistochemická barvení byla provedena na cévách získaných z geneticky modifikovaného kmene myši. Jednalo se o samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru vážící 15-20 gramů.

Odebrané segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (*Leica, Praha, Česká republika*), následně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 µm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese SMAD 2/3 a endoglinu byla použita metodika EnVision s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

Primární protilátky

K detekci exprese markeru SMAD 2/3 v cévní stěně byla použita pro světelnou mikroskopii monoklonální protilátka Rabbit Anti-Mouse SMAD 2/3 ve zředění 1/100 (*Pharmingen, USA*).

Sekundární protilátky

Jako sekundární protilátka byla pro světelnou mikroskopii použita monoklonální protilátka Goat anti-rabbit - Envision (*DAKO, Carpinteria, USA*).

Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu byl použitý diaminobenzidín (DAB substrát-chromogen roztok, *DAKO, Carpinteria, USA*).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (*Vitana Corp., USA*) za pomoci softwaru NIS (*Laboratory Imaging Prague, Česká republika*).

Pracovní postup***EnVision systém – detekce exprese SMAD2/3***

- 1) sušení tkáňových řezů v termostatu (60min)
- 2) fixace v acetonu (-20°C; 30min)
- 3) oschnutí řezů (15min)
- 4) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 5) aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (30 min)
- 6) aplikace primární protilátky (inkubace 60 min)
- 7) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 8) promytí v 3% BSA (15 min)
- 9) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 10) aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
- 11) promytí v PBS (2 x 5 min)
- 12) inkubace s roztokem chromogenu (DAB) (dobu inkubace různá pro každou protilátku)
- 13) oplach řezů v acetonu
- 14) odvodnění řezů (aceton)
- 15) odvodnění řezů (aceton-xylen 10/1) (3 min)
- 16) odvodnění řezů (aceton-xylen 1/10) (3 min)
- 17) odvodnění řezů (xylen) (3 x 2 min)
- 18) montování řezů do Eukittu

3.2.4 Statistická analýza

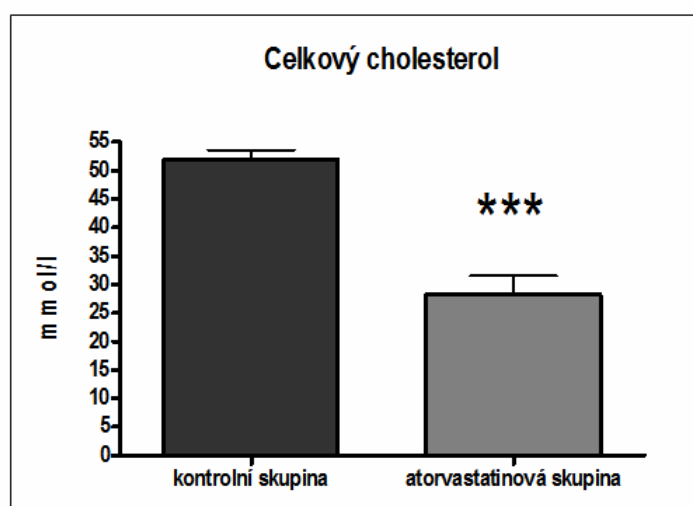
Statistická analýza byla provedena za využití statistického softwaru SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation). Ke vzájemnému porovnání parametrů u jednotlivých skupin zvířat byl použit neparametrický T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$.

40'VÝSLEDKY

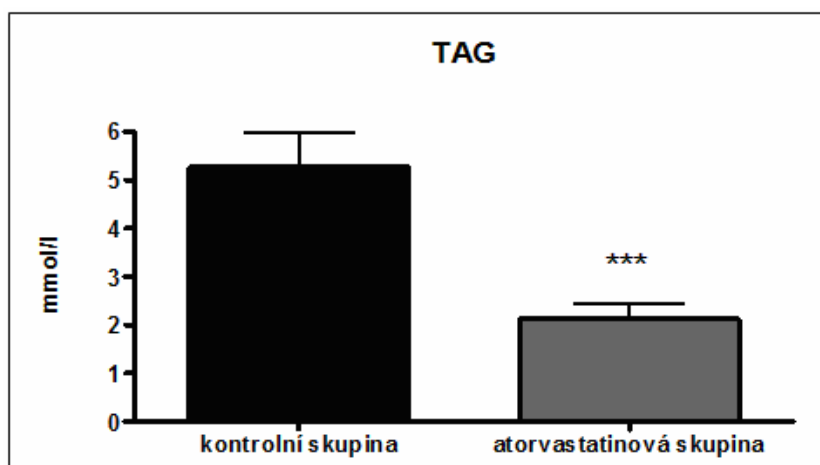
4.1 Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolů (TAG). Výsledky prokázaly, že osmitýdenní podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg statisticky významně snížilo hladiny obou parametrů, tedy hladiny celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou ($***P \leq 0,001$) a hladiny triacylglycerolů ve srovnání s kontrolní skupinou ($***P \leq 0,001$) (viz. graf 2 a 3).

Graf.2 Hladiny celkového cholesterolu u experimentálních myší.



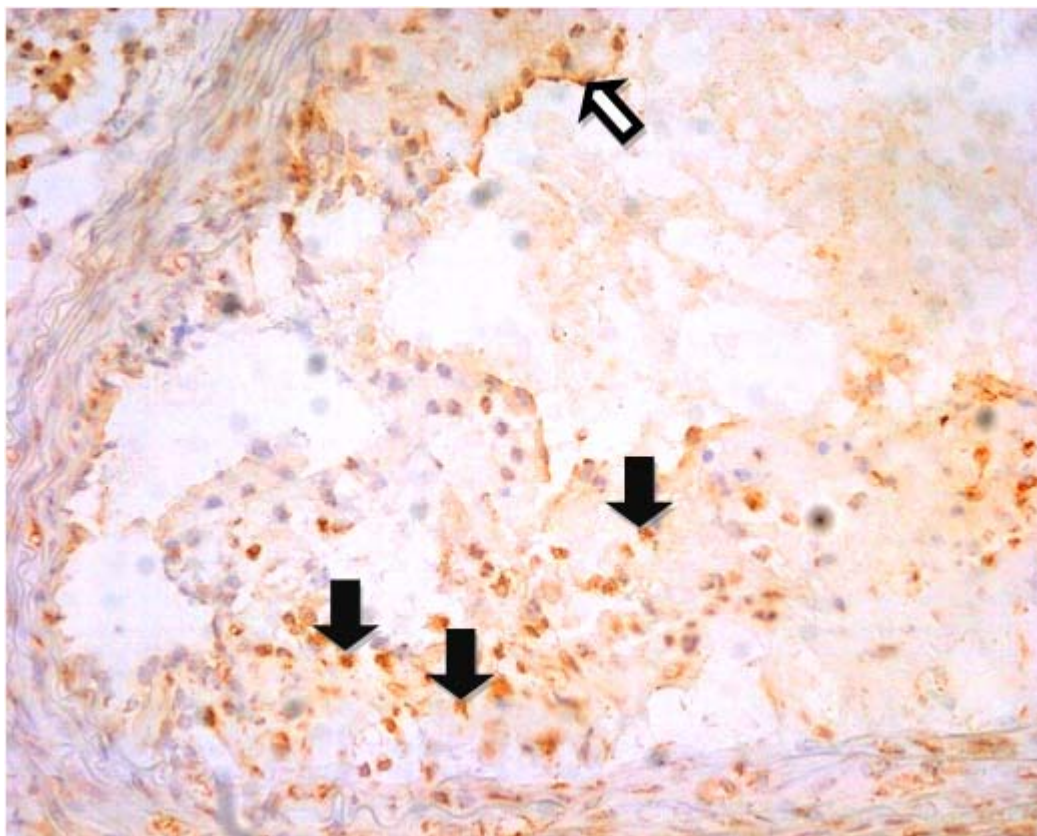
Graf.3 Hladiny triacylglycerolů u experimentálních myší.



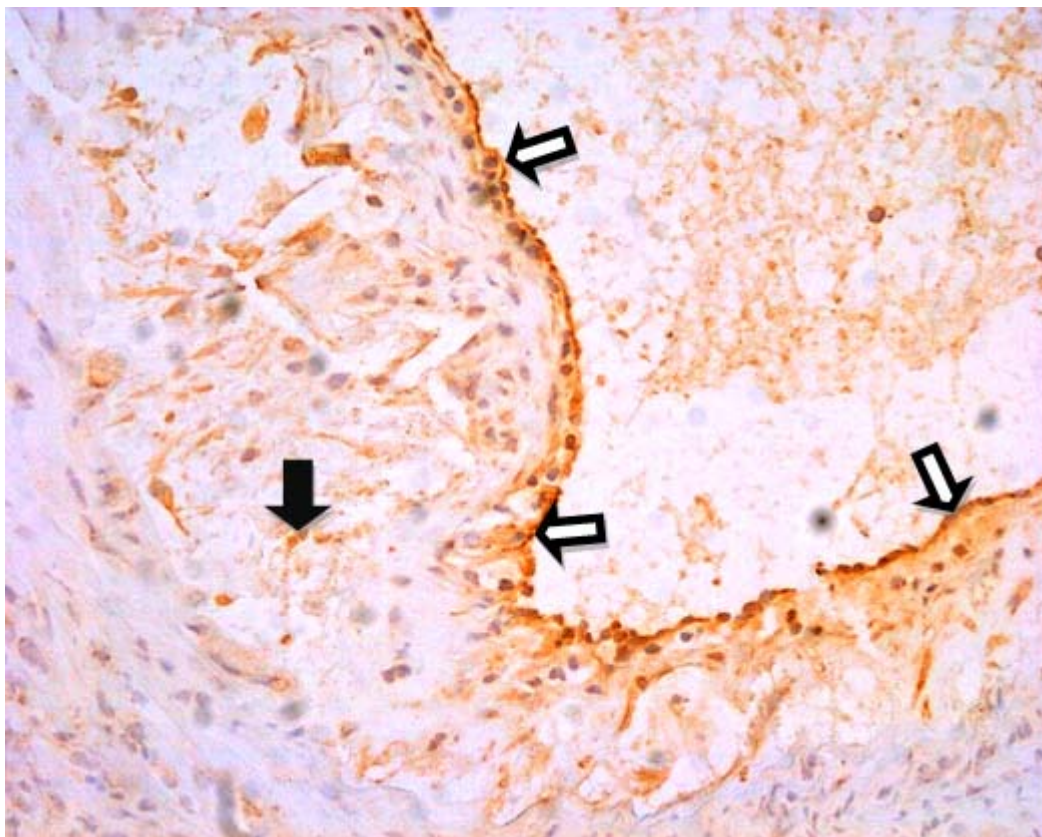
4.2 Imunohistochemická analýza

Imunohistochemické barvení SMAD 2/3 v oblasti aortálního sinu

Imunohistochemická analýza prokázala expresi SMAD 2/3 v oblasti aterosklerotických plátů. Expres byla konkrétně nalezena uvnitř plátu, na cévním endotelu plátu i mimo něj (viz obr. 9 a 10).



Obr.8 Imunohistochemické barvení SMAD 2/3 u kontrolní skupiny. Expres SMAD 2/3 je pozorována v jádrech buněk intimy cévy (aterosklerotický plát, černé šipky) a částečně také na cévním endotelu plátu (bílá šipka). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem, zvětšeno 200x.

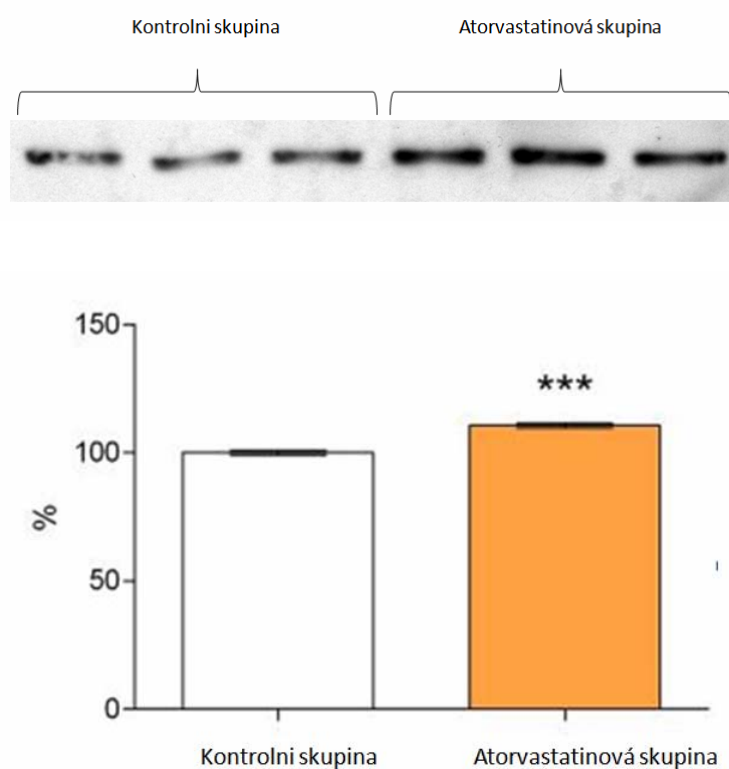


Obr.9 Imunohistochemické barvení SMAD 2/3 u atorvastatinové skupiny. Expres SMAD 2/3 je pozorována v některých jádrech buněk intimy cévy (aterosklerotický plát, černé šipky). Výrazná exprese je pozorována zejména na cévním endotelu plátu (bílé šipky). Buněčná jádra jsouobarvena hematoxylinem, zvětšeno 200x

4.3 Western Blot analýza

Western blot analýza exprese SMAD 2/3

Western blot analýza exprese SMAD 2/3 měla za cíl prokázat celkovou expresi SMAD 2/3 ve stěně hrudní a břišní aorty. Výsledky prokázaly statisticky významný nárůst exprese SMAD 2/3 po podávání atorvastatinu ve srovnání s kontrolní skupinou (** $p < 0.01$). (viz. obr. 10).



Obr.10 Western blot analýza exprese SMAD 2/3 v oblasti hrudní a břišní aorty u kontrolní a atorvastatinové skupiny.

5. DISKUZE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují až v pozdějších letech života, jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze [4]. V souvislosti se zánětem se intenzivně studuje úloha adhezivních molekul, složek imunitního systému, ale i dalších faktorů modifikujících zánětlivou reakci, které tak obecně participují na rozvoji a vzniku klinických komplikací aterosklerózy [38]. Za základní a první krok v patogenezi aterosklerózy je dnes považována endoteliální dysfunkce charakterizovaná aktivací endotelu s následnou expresí zánětlivých, proliferčních a vazokonstrikčních markerů.

V terapii hyperlipidemií a cévních komplikací (aterosklerózy) jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky statiny. Statiny (někde uváděny též pod názvem vastatiny) jsou v současné době považovány za nejúčinnější hypolipidemika. Jsou to kompetitivní inhibitory klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu - 3-hydroxyl-3-methylglutarylkoenzymA-reduktázy (HMG-CoA reduktázy). Jednotlivé statiny se liší relativní účinností avšak nelipidovým působením, tj. antiagregačním, antiproliferativním účinkem, vlivem na úpravu endoteliálních funkcí, stabilizací ateromatózních plátů aj. [33]. Cílovým orgánem zásahu statinů jsou játra.

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myši za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u vybraných kmenů myši začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu [39].

Ačkoli se tento model nejprve vyvíjel slibně, měl dva zásadní problémy. Oproti lidským aterosklerotickým lézím, které se vyskytují ve větvích hlavních cév, kde pláty progredují, myši léze jsou malé, vyskytují se pouze v oblastech aortálního oblouku

a nedochází k jejich progresi. Strava, kterou jsou myši krmeny, je nefyziologická, obsahuje 10 - 20x více cholesterolu a žlučových kyselin. Tato strava vyvolá chronický zánět pouze u citlivých kmenů myší, nikoli u kmenů ateroskleroticky rezistentních, což zvyšuje možnost dohady, že genetické rozdíly mezi danými kmeny myší jsou dány spíše rozdíly v reakci na podanou stravu.

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která přinesla myši deficientní v genu pro apolipoprotein E (apoE) [40]. ApoE apoproteiny jsou tvořeny primárně v játrech, mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a i při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myší se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a subklaviálních arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech a léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech diety. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myší se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneurysmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly [41].

ApoE/LDL receptor deficientní myši vyvíjí výraznou spontánní hypercholesterolemii a aterosklerotické léze již v pátém týdnu svého života. V osmém týdnu již mají pokročilé léze v oblasti aortálního sinu, jejichž vývoj lze samozřejmě ještě urychlit podáváním aterogenní diety. Z tohoto důvodu je tento model považován za velmi dobrý zvířecí model pro studium hypolipidemik [42].

SMAD (Small Mothers Anti Decapentaplegic) je třída intracelulárních proteinů podílejících se na transdukci signálu z TGF lidandů [27].

Rozlišujeme 3 podskupiny SMADů: tzv. receptory regulované- R-SMADs, (SMAD 1,2,3,5 a 9), kooperační- co-SMAD (SMAD 4) a inhibiční- I-SMADs (SMAD 6,7). SMAD 2 a 3 jsou aktivovány jako odpověď na TGF nebo aktiviny, SMAD 1, 5 a 9 odpovídají na signály BMP [43].

Tyto SMAD proteiny jsou součástí TGF- β cytokinové kaskády a také součástí kaskády endoglinu. TGF- β 1 cytokin a transmembránový protein endoglin jsou exprimovány cévním endotelem [44]. TGF- β 1 cytokin má v aterogenezi řadu účinků, které pravděpodobně částečně souvisí s jeho interakcí s endoglinem a následně aktivitou SMAD proteinů [45]. Poslední studie *in vitro* prokázaly, že aktivace SMAD 2/3 a jeho přesunu do buněčného jádra vede ke zvýšené expresi endoteliální NO syntézy (eNOS), která má velmi důležité protektivní účinky na cévní endotel a také aterogenezi [26]. Tato diplomová práce se zabývá právě expresí SMAD 2/3 v aortě apoE/LDLR deficientních myší. SMAD 2/3 protilátka, která byla používána je schopná označit právě pouze aktivovanou formu SMAD 2/3, tedy tu, která se nachází zejména v buněčném jádře. Výsledky prokázaly silnou expresi SMAD 2/3 na cévním endotelu, zejména u zvířat, kterým je podáván atorvastatin. Dále byla exprese SMAD 2/3 pozorována také v intimě cév a okolním myokardu, zejména jeho kapilárách. Western blot analýza prokázala statisticky významné zvýšení exprese SMAD 2/3 po podávání atorvastatinu ve srovnání s kontrolní skupinou. Tento výsledek společně s dalšími výsledky dosaženými na katedře Biologických a lékařských věd ukazují, že celá endoglin-SMAD kaskáda je pozitivně stimulována atorvastatinem. Tento jev naznačuje, že SMAD 2/3 by mohl také působit antiaterogenně a mohl by mít pozitivní vliv zejména na vlastnosti cévního endotelu.

6. ZÁVĚR

Výsledky této diplomové práce prokázaly expresi SMAD 2/3 v aterosklerotických plátech cévní stěny u apoE/LDLR deficientního myšího modelu aterosklerózy.

SMAD 2/3 jako signální protein kaskády, která je spouštěna endoglinem byl exprimován v celém aterosklerotickém plátu, přičemž jeho exprese byla pozorována také na cévním endotelu v plátu i mimo něj a to v kontrolní i atorvastatinové skupině.

Podávání atorvastatinu v dávce 100 mg/kg/den vedlo k výraznému hypolipidemickému efektu.

Western blot analýza prokázala nárůst exprese SMAD 2/3 ve stěně cévy po podávání atorvastatinu.

Tyto výsledky naznačují, že SMAD 2/3 může být potenciálním cílem účinku atorvastatinu. Zároveň by mohl také působit antiaterogenně a mohl by mít pozitivní vliv zejména na vlastnosti cévního endotelu.

7. LITERATURA

- [1] Vanhoutte PM. [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. Arch Mal Coeur Vaiss 1997;90 Spec No 6:9-19.
- [2] Klika E., Vacek Z., Dvořák M., Kapeller K. Histologie. Praha Avicenum 1983;15 420/83-31.
- [3] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 1999;340:115-26.
- [4] Keaney JF, Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. Mol Aspects Med 2000;21:99-166.
- [5] Pedraza A. [Hyperlipoproteinemia in the production of atherosclerosis. Risk factors: diagnosis and treatment]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba 1993;51:21-33.
- [6] D'Agostino RB, Jr., Hamman RF, Karter AJ, Mykkanen L, Wagenknecht LE, Haffner SM. Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. Diabetes Care 2004;27:2234-40.
- [7] Iacoviello L, Donati MB, de Gaetano G. [Novel risk factors for atherosclerosis. A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a) and cholesterol as predictors of peripheral arteriopathy]. Ital Heart J Suppl 2001;2:1031-3.
- [8] Hallan S, de Mutsert R, Carlsen S, Dekker FW, Aasarod K, Holmen J. Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? Am J Kidney Dis 2006;47:396-405.
- [9] Shantaram V. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. Clin Exp Hypertens 1999;21:69-77.
- [10] Watanabe H, Kosuge K, Nishio S, Yamada H, Uchida S, Satoh H, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between simvastatin and diltiazem in patients with hypercholesterolemia and hypertension. Life Sci 2004;76:281-92.
- [11] Coniglio RI, Colombo O, Vasquez L, Salgueiro AM, Otero JC, Malaspina MM. [Central obesity: relationship between conicity index and lipoprotein risk factors for coronary atherosclerosis]. Medicina (B Aires) 1997;57:21-8.

[12] Smith SC, Jr. The challenge of risk reduction therapy for cardiovascular disease. *Am Fam Physician* 1997;55:491-500.

[13] Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR, Coresh J. Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:529-38.

[14] Catena C, Novello M, Lapenna R, Baroselli S, Colussi G, Nadalini E, et al. New risk factors for atherosclerosis in hypertension: focus on the prothrombotic state and lipoprotein(a). *J Hypertens* 2005;23:1617-31.

[15] Wang Q. Molecular genetics of coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2005;20:182-8.

[16] Semenkovich CF, Heinecke JW. The mystery of diabetes and atherosclerosis: time for a new plot. *Diabetes* 1997;46:327-34.

[17] Laurila A, Bloigu A, Nayha S, Hassi J, Leinonen M, Saikku P. Chronic Chlamydia pneumoniae infection is associated with a serum lipid profile known to be a risk factor for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2910-3.

[18] Dowell FJ, Hamilton CA, Lindop GB, Reid JL. Development and progression of atherosclerosis in aorta from heterozygous and homozygous WHHL rabbits. Effects of simvastatin treatment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1152-60.

[19] Mangge H, Hubmann H, Pilz S, Schauenstein K, Renner W, Marz W. Beyond cholesterol--inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:467-74.

[20] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1994;14:840-56.

[21] Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993;69:S30-7.

- [22] Yuan C, Zhang SX, Polissar NL, Echelard D, Ortiz G, Davis JW, et al. Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke. *Circulation* 2002;105:181-5.
- [23] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*.1993;362:801-809.
- [24] Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliansky VE, et al. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:975-82.
- [25] McCaffrey TA, Du B, Fu C, Bray PJ, Sanborn TA, Deutsch E, et al. The expression of TGF-beta receptors in human atherosclerosis: evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1627-42.
- [26] Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal F, Silvestri C, Saura M, Vary CP, et al. Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 2007;210:456-68.
- [27] Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res* 2005;65:599-608.
- [28] Vaughan CJ, Gotto AM, Jr., Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1-10.
- [29] Czuriga I, Edes I. [Lowering cholesterol: how low is low enough?]. *Orv Hetil* 2006;147:1349-56.
- [30] Davignon J, Mabile L. [Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2001;62:101-12.
- [31] Duriez P. [Mechanisms of actions of statins and fibrates]. *Therapie* 2003;58:5-14.
- [32] Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 1996;348:1079-82.

- [33] Arnaud C, Mach F. Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005;98:661-6.
- [34] Ikeda U, Shimada K. Pleiotropic effects of statins on the vascular tissue. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2001;1:51-8.
- [35] Bellosa S, Ferri N, Arnaboldi L, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes. *Diabetes Care* 2000;23 Suppl 2:B72-8.
- [36] Tonolo G, Brizzi P, Melis MG, Secchi G, Maioli M. About the pleiotropic effects of statins in human. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1234.
- [37] Endres M, Laufs U. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 2004;35:2708-11.
- [38] Nilsson J. Regulating protective immunity in atherosclerosis. *Circ Res* 2005;96:395-7.
- [39] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987;68:231-40.
- [40] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Tromb* 1994;14:133-40.
- [41] Hofker MH, Breuer M. Generation of transgenic mice. *Methods Mol Biol* 1998;110:63-78.
- [42] Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4431-5.
- [43] Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 2005;204:574-84.

[44] Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2000;153:323-35.

[45] Obreo J, Diez-Marques L, Lamas S, Duwell A, Eleno N, Bernabeu C, et al. Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblast